

# Stanovení mikrobiologických ukazatelů pitné vody, technika vyšetřování, hodnocení

## **Teoretická část:**

Pitná voda

Definice pitné vody, základní pojmy ( mezná hodnota, nejvyšší mezná hodnota, individuální zásobování, hromadné zásobování, vyhláška 252,2004

### Mikrobiologický rozbor pitné vody.

#### *Koliformní bakterie:*

Gramnegativní tyčinky z čeledi Enterobacteriaceae, netvořící spory. Mají negativní cytochromoxidázový test a zkvašují laktózu při 37°C do 43 hod. za současné tvorby kyselin a plynu. Mají podobné morfologické i fyziologické vlastnosti jako *Escherichia coli*. Jsou důležitým hygienickým indikátorem fekálního znečištění pitné vody.

#### *Mezofilní bakterie:*

Mikroorganismy rostoucí na masopeptonovém agaru s optimem růstu při teplotě 37°C. Jsou indikátorem znečištění mikroflórou teplokrevných živočichů a člověka.

#### *Psychofilní bakterie:*

Mikroorganismy rostoucí na masopeptonovém agaru s optimem růstu při teplotě 20°C. Jsou indikátorem mikrobiálního rozkladu rychle rozložitelných organických látek za nižších teplot.

#### *Enterokoky:*

Skupina grampozitivních streptokoků vyskytujících se v zažívacím traktu člověka a živočichů. Jsou vylučovány fekáliemi do prostředí. Vyznačují se relativně vyšší jak termorezistencí, tak rezistencí vůči fyzikálním a fyzikálně chemickým podmínkám.

### Odběr a příprava vzorků.

- Odběr provádí pracovník s odborným vzděláním
- Při odběru nesmí dojít ke kontaminaci vzorku
- Vzorek se odebírá do sterilní zábrusové láhve
- Odběrová láhev se otevírá těsně před odběrem.

- Při odběru není dovoleno dotýkat se zabroušených částí zátky a hrdla, ani se nesmí odkládat zátky. Po uzavření se zátky překryje hliníkovou fólií.
- Při odběru z vodovodního kohoutku nebo z pumpy se voda nechá odtéct a potom se naplní odběrová láhev

### Praktická část:

#### 1. úkol:

##### Samostatný odběr pitné vody ze zdroje podle vlastního výběru.

Odběr bude proveden podle výše uvedených kritérií ze studny, studánky.

#### 2. úkol:

##### Stanovení koliformních bakterií metodou membránových filtrů.

Stanovení spočívá v zachycení mikroorganismů na membránovém filtru, kultivací na CCA agaru (Chromogenic Coliform agar).

Přes membránový filtr se přefiltruje 100 ml vzorku vody určené pro hromadné zásobování, u vzorků vody určené pro individuální zásobování 10 ml. Po filtraci se membránový filtr přenesení pomocí sterilní pinzety na uvedenou půdu. Filtr musí k půdě dobře přilnout. Misky se kladou dnem vzhůru do termostatu a kultivují při teplotě 37°C 24 hod.

Po kultivaci membránových filtrů se všechny β- D- galaktozidáza pozitivní kolonie ( růžové až červené) počítají jako presumptivní **koliformní bakterie** , které nejsou ***Escherichia coli***.

Všechny β- D-galaktozidáza a β- D- glukuronidáza pozitivní kolonie (tmavě modré až fialové) se počítají jako ***Escherichia coli***.

Pro potvrzení presumptivních koliformních bakterií, které nejsou *E.coli* se provádí oxidázový test. Použijeme komerčně dostupný oxidázový test. Pozitivní oxidázová reakce se projeví sytě modrým zbarvením během 30s. Toto zbarvení nelze pozorovat u koliformních bakterií, protože jsou oxidáza negativní.

#### 3. úkol:

##### Stanovení koliformních bakterií kvasnou zkouškou.

Zkouška spočívá v pomnožení koliformních bakterií v tekuté půdě při teplotě 37°C po dobu 48 hod. za současné tvorby kyseliny a plynu.

Do dvou zkumavek s plynovkami obsahujících 10 ml tekuté laktozové půdy (Savageova půda) se přidá 10 ml a 1 ml vzorku vody. Inkubují se v termostatu při 37<sup>0</sup>C po dobu 48 hod. Za pozitivní výsledek se považuje současná tvorba kyselin (sežloutnutí půdy) a tvorba plynu (bublina v plynovce), nebo pouhá tvorba kyselin.

4. úkol:

#### Stanovení enterokoků:

Stanovení enterokoků je založeno na počítání kolonií po membránové filtraci a kultivaci při 37<sup>0</sup>C.

Přes membránový filtr se přefiltruje 100 ml vzorku vody určené pro hromadné zásobování nebo 10 ml vzorku vody určené pro individuální zásobování. Filtry se sterilní pinzetou kladou do Petriho misek na agarovou půdu s azidem sodným (Slanetz – Bartleyova půda). Misky se kultivují 48 hod. při 37<sup>0</sup>C.

Po kultivaci se počítají úplně i částečně červeně až tmavohnědě zbarvené kolonie.

5. úkol:

#### Stanovení mezofilních bakterií:

Stanovení je založeno na počítání kolonií mikroorganismů po kultivaci na masopeptonovém agar (Plate count agar) při teplotě 37<sup>0</sup>C.

Do dvou Petriho misek se napipetuje po 1 ml vzorku a ihned se zaleje 15 ml agar, ochlazeného přibližně na teplotu 45<sup>0</sup>C. Miska se uzavře a živná půda se krouživým pohybem opatrně promísí se vzorkem. Při míchání se půda nesmí dostat přes okraj misky. Po ztuhnutí se misky ukládají do termostatu dnem vzhůru a kultivují se při teplotě 37<sup>0</sup>C 48 hod. Vyrostlé kolonie se na obou Petriho miskách spočítají, vypočítáme průměrný počet z obou misek., což je počet kolonií v 1 ml vzorku vody.

6.úkol:

#### Stanovení psychrofilních bakterií:

Stanovení je založeno na počítání kolonií mikroorganismů po kultivaci na masopeptonovém agaru při teplotě 20<sup>0</sup>C.

Postup je stejný jako v úkolu č. k5, kromě toho, že po ztuhnutí se půdy ukládají dnem vzhůru do termostatu a kultivují při teplotě 20<sup>0</sup> C 72 hod.

7.úkol:

Provedení cytochromoxidázového testu, odečtení výsledků kultivací.

8. úkol:

Vypracování protokolu